



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y
Antiteratogénesis

**Efecto de los extractos polifenólicos del té verde [P60]
sobre la reparación del daño al ADN en ratones Hsd:ICR
tratados con compuestos de cromo hexavalente**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

BAUTISTA CONTRERAS ALAN AMAURY



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Este trabajo se realizó en el
Laboratorio de Antimutagénesis,
Anticarcinogénesis y
Antiteratogénesis de la Facultad de
Estudios Superiores Zaragoza,
UNAM.

La investigación fue realizada gracias al
Programa de Apoyo a Proyectos de
Investigación e Innovación Tecnológica
(PAPIIT) de la UNAM IN216122. Proyecto
“Efecto dosis-respuesta *in vivo* de los polifenoles
contra el daño genotóxico inducido por cromo
hexavalente: vías mecanicistas subyacentes”. Se
contó con beca de titulación: Proyectos de
Investigación (elaboración de tesis).

*"Abre la mente a lo que te manifiesto y aférralo dentro; que no se
hace ciencia, sin retención de lo que se ha entendido"*

Dante Alighieri

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, mi *alma mater* y a la FES Zaragoza, en donde me he desarrollado no solo en el ámbito intelectual y profesional, sino también en el personal. Le agradezco la oportunidad de haber pertenecido a su comunidad y los apoyos económicos que me ha otorgado, pero, sobre todo que en esta he tenido de las mejores experiencias de mi vida, aprendizajes y el haber conocido a las mejores amistades que cualquiera pudiera tener, así como el poder conocer a profesores asombrosos que dan todo el corazón en sus clases para que nosotros, los alumnos, podamos aprender parte de sus conocimientos y experiencia para que logremos desarrollarnos como profesionalitas y personas.

A la Dra. **María del Carmen García Rodríguez** por aceptarme en su grupo de investigación y, sobre todo, por su paciencia y apoyo en todo este proceso.

A los miembros del jurado por ser grandes profesores cuando fui su alumno, además de todos sus comentarios y apoyarme durante el proceso de esta tesis:

Dra. Castillo Granada Alberta Lourdes

M. En C. Alvarado Domínguez María Cristina

M. En C. Roldan Pérez Reynalda

M. En C. Hernández Cortés Lourdes Montserrat

DEDICATORIAS

“La gratitud se da cuando la memoria se almacena en el corazón y no en la mente.”

Lionel Hampton

Con todo mi corazón:

A mi padre, **Blas Bautista Vargas** y a mi querida amiga **Sara Bravo Moreno**, en paz descansen.

A mi madre **María de Lourdes**, a mis tíos **Elena** y **Rafael**, y a mis primos **Belén** y **Luis** por haberme apoyado tanto emocionalmente como económicamente durante toda la carrera, por esas reuniones familiares y, sobre todo, por creer en mi en cada etapa de mi vida y no rendirse nunca conmigo.

A mis hermanos y hermanas de otros padres, que, a pesar de no compartir lazos de sangre los considero como las personas más especiales de mi vida al igual que mi familia: **Mariana Elsy**, **Patricia Lucero**, **Christian Vera**, **Irán Roma**, **Marco Martínez**, **Liliana Jiménez** y **Luis Ángel**, ya que, a lo largo de mi vida me han brindado apoyo incondicional en los mejores y peores momentos, por ayudarme a salir adelante, ser una fuente de inspiración a cada paso que doy y por no dejarme solo. No tengo palabras para expresar cuan agradecido estoy con ustedes por ser como son y por el simple hecho de conocerlos. Los llevaré en mi mente y corazón a donde sea que vaya en el futuro.

A mis compañeras y amigas de laboratorio, **Joss**, **Nancy**, **Lupita** y **Andy**, por apoyarme y acompañarme durante todo el proceso de tesis y de la fase experimental de la misma. También a **Lulú** y **Tona**, por ser mis mentoras y amigas, por toda su paciencia conmigo durante los experimentos e instruirme cuando tenía alguna duda.

Finalmente, a mis perritos **Totis** y **Gohan**, por acompañarme en cada noche de desvelo y recibirme siempre que llego a casa.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Agentes genotóxicos.....	5
2.1.1. Ensayo de micronúcleos.....	6
2.2. Reparación del ADN.....	7
2.2.1. Ensayo cometa.....	8
2.3. Estrés oxidante.....	9
2.4. Metales pesados como agentes inductores de estrés oxidante.....	10
2.5. Antioxidantes.....	11
2.5.1. Polifenoles.....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4. HIPOTESIS	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1. General.....	15
5.2. Particulares	15
6. MATERIAL Y MÉTODO	16
6.1. Animales.....	16
6.2. Reactivos.....	16
6.3. Tratamientos y dosis	17
6.4. Ensayo de micronúcleos	19
6.5. Ensayo cometa	19
6.6. Análisis estadístico.....	20
7. RESULTADOS	21
7.1. Evaluación de micronúcleos.....	21
7.2. Evaluación de ensayo cometa.....	23
7.3. Relación EPC/ENC	30
8. DISCUSIÓN	32
9. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES.....	37
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

I. RESUMEN

Se ha mostrado que los extractos polifenólicos del té verde (P60) tiene efectos protectores contra agentes genotóxicos como los compuestos de cromo hexavalente (Cr[VI]). Sin embargo, aunque se ha planteado a la activación de la reparación como una de las posibles vías de protección, no hay estudios al respecto. En este trabajo se evaluó el efecto de los extractos polifenólicos del té verde en ratones Hsd:ICR tratados con Cr(VI) mediante el ensayo de micronúcleos (MN), los rompimientos de cadena sencilla y doble del DNA y la relación de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos (EPC/ENC). Ratones macho de la cepa Hsd:ICR se dividieron en 4 grupos de cinco cada uno, los cuales fueron tratados de la siguiente manera: I) grupo testigo, se le administró el vehículo; II) Grupo P60, se le administró por vía intragástrica (i.g.) los extractos polifenólicos de té verde, 30 mg/kg; III) Grupo Cr(VI), se le administró una dosis de 20 mg/kg de CrO₃ por vía intraperitoneal (i.p.); IV) Grupo experimental, se le administró el P60 4 h previo al tratamiento de CrO₃, en las dosis y vías ya mencionadas. Se tomaron muestras de sangre periférica a las 0, 24, 48 y 72 h para el ensayo de MN y a las 0, 4, 24, 48 y 72 h para la evaluación de los rompimientos de ADN (ensayo cometa alcalino). El tratamiento de CrO₃ indujo daño genotóxico y citotóxico ya que incrementa las frecuencias de MN, las rupturas de cadena sencilla y doble, además de modificar la relación de EPC/ENC. Los extractos polifenólicos del té verde no indujeron daño genotóxico, ni citotóxico, al no aumentar las frecuencias de MN, rupturas de cadena sencilla y doble en el ADN, ni modificaron la relación de EPC/ENC. Los extractos polifenólicos del té verde presentaron efectos antigenotóxicos al disminuir las frecuencias de MN y las rupturas de cadena sencilla y doble del ADN inducidas por el CrO₃. Finalmente, el hecho de que se hayan disminuido las rupturas de cadena sencilla y doble en el ADN a partir de las 4 h, en el grupo tratado con los extractos polifenólicos del té verde previo a la exposición al CrO₃, sugiere que el extracto pudo haber reactivado la reparación del daño oxidativo en el ADN inducido por el CrO₃.

II. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianzas
ARN	Ácido ribonucleico
BER	Reparación por escisión de bases (del inglés Base Excision Repair)
BrEt	Bromuro de etidio
Cr	Cromo
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(VI)	Cromo hexavalente
CrO ₃	Trióxido de cromo
EC	Ensayo cometa
E-C	(-)-epicatequina
EGC	(-)-epigallocatequina
EGCG	(-)-epigallocatequina-3-galato
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EPA	Agencia de protección ambiental (del inglés Environmental Protection Agency)
EPC	Eritrocitos policromáticos
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (del inglés International Agency for Research on Cancer)
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
MN	Micronúcleo (s)
NA	Naranja de acridina
NER	Reparación por escisión de nucleótidos

OGG1	8-oxo-guanina-glucosilasa
P60	Extractos polifenólicos del té verde
RL	Radicales libres
UA	Unidades arbitrarias
XRCC1	Grupo 1 de complementación cruzada de reparación de rayos X (del inglés X-ray repair cross-complementation group 1)
•OH	Radical hidroxilo
8-OHdG	8-hidroxidesoxiguanosina

1. INTRODUCCIÓN

La industrialización y el surgimiento de nuevas tecnologías han contribuido en el aumento de la contaminación ambiental, siendo los metales pesados uno de los principales componentes (EPA, 2010; Tchounwou *et al.*, 2012). En particular los compuestos del cromo hexavalente [Cr(VI)] han sido muy estudiados porque están clasificados como agentes mutagénicos y carcinogénicos por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) (IARC, 1990). Sus efectos tanto mutagénicos como carcinogénicos han sido asociados al estrés oxidante generado durante la reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) (O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko, 2011). También se ha observado que la mutagenicidad de los compuestos de Cr(VI) puede estar implicada en la pérdida de actividad de genes importantes para la reparación del ADN (García-Rodríguez *et al.*, 2017). De ahí que, se ha propuesto el uso de antioxidantes como estrategia para contrarrestar los efectos del estrés oxidante. Se ha observado que, la acción de los polifenoles no solo comprende la captura de las especies reactivas de oxígeno (ERO), sino también previene su formación, inhibe su propagación y puede activar enzimas de reparación (Zhang y Tsao, 2016; Ahmad *et al.*, 2023). En estudios previos, realizados en nuestro laboratorio se observó que los extractos polifenólicos del té verde reducen el daño genotóxico inducido por Cr(VI), sugiriendo que la activación de la reparación del daño al ADN podría estar implicada en las vías de protección (García-Rodríguez *et al.*, 2013). En el presente trabajo se estudiaron los efectos de los extractos polifenólicos del té verde sobre la inducción de micronúcleos (MN) y los rompimientos de cadena sencilla y doble en ratones Hsd:ICR tratados con compuestos de Cr(VI).

2. ANTECEDENTES

2.1. Agentes genotóxicos

Se define como tóxico a cualquier agente capaz de producir una respuesta desfavorable en un sistema biológico. En este grupo encontramos una clase particular, la cual produce una alteración/daño en el material genético o en sus componentes, por lo que se les reconoce como agentes genotóxicos. Dentro de esta clasificación están los agentes que interaccionan directa o indirectamente con el ADN (ocasionando mutaciones) y los que interfieren en procesos enzimáticos de la reparación, génesis o polimerización de proteínas involucradas en la segregación cromosómica. De acuerdo con su efecto se pueden clasificar como mutágenos y carcinógenos (Zuluaga *et al.*, 2009; Pfau, 2012). Un agente mutágeno es aquella sustancia o preparado que puede producir una alteración en el ADN y alterar el control de la actividad celular, conduciendo a un malfuncionamiento de esta. La alteración del ADN de una célula puede darse como un cambio en la composición, una alteración del ajuste físico del mismo o como una adición o supresión de cromosomas (Zuluaga *et al.*, 2009). Por otro lado, un agente cancerígeno es cualquier agente físico, químico o biológico capaz de dar origen a una neoplasia, llegando inclusive a desarrollar cáncer en el organismo. Se ha reportado la inducción de cáncer está asociada con factores ambientales que pueden relacionarse con el estilo de vida o a la exposición ocupacional (Carrera, 1997; Zuluaga *et al.*, 2009). Se sabe que existe una relación entre la carcinogenicidad y la mutagenicidad, esta se refleja sobre la base de reacciones moleculares de metales con ácidos nucleicos o proteínas. La reacción directa con el ADN, el entrecruzamiento, la generación de radicales y la interacción con procesos de reparación son válidos para la inducción de mutaciones y, en consecuencia, la generación del cáncer (Gebhart, 2008; Pfau, 2012).

Así entonces tenemos que el daño genético o genotóxico se define como el deterioro de las instrucciones del ADN. Desde los cambios o eliminación de las bases nitrogenadas hasta la eliminación/inhibición de cromosomas completos o grupos de cromosomas. Debido a esto, surge la toxicología genética, la cual tiene como objeto de estudio los efectos adversos sobre el proceso de la herencia. En particular, la evaluación de la genotoxicidad está dirigida a eliminar los carcinógenos genotóxicos lo antes posible y las técnicas que se utilizan para medir este daño son muy diversas (Krishna y Hayashi, 2000; Evarista *et al.*, 2012; Nesslany, 2017). De acuerdo con Montaña-Rodríguez (2013), las técnicas de detección del daño genotóxico se pueden agrupar con base en el tipo de alteración que detectan.

2.1.1. Ensayo de micronúcleos

Los MN son masas de cromatina que tienen forma de núcleos pequeños y que aparecen cerca del núcleo principal en las células interfásicas; pueden ser cromosomas completos rezagados por daño al uso mitótico, o bien fragmentos de cromosomas sin centrómero, en cualquiera de los casos, no lograron incorporarse a ninguno de los núcleos de las células hijas. Los MN se pueden originar de manera espontánea como resultado del envejecimiento celular o como respuesta a agentes genotóxicos específicos. Debido a esto, la presencia de MN constituye un biomarcador de efecto genotóxico, siendo indicador de agentes mutágenos o genotóxicos. El ensayo de MN se puede realizar *in vivo* y en cualquier tejido que esté en proliferación como la médula ósea o eritrocitos de sangre periférica donde el bazo no elimine eritrocitos micronucleados (FDA, 2000; Arellano *et al.*, 2012; Torres-Bugarín *et al.*, 2013).

2.2. Reparación del ADN

Durante el ciclo celular se presentan varios puntos control que se encargan de regular la proliferación celular, el crecimiento y la síntesis del ADN. Estos se encuentran principalmente en la transición de las fases G1/S y G2/M, donde pueden evitar la progresión del ciclo celular en presencia de ADN dañado. Al hacer esto permiten que mecanismos de reparación se produzcan al mismo tiempo y se prevengan alteraciones genéticas heredables (Lagunas-Cruz *et al.*, 2014). Estos son procesos propios de la célula que reconocen, remueven y reparan errores en su ADN, constituyendo mecanismos celulares que garantizan la estabilidad genética. Los mecanismos de reparación actúan como defensa ante carcinógenos, fármacos terapéuticos, respuesta celular y susceptibilidad individual a agentes tóxicos (Tafurt y Marin, 2014). Los daños en el ADN generados durante el ciclo celular se pueden ir acumulando con el tiempo y, aunque la mayoría permanecen silenciosos, algunas generan cambios funcionales que, al expresarse pueden ocasionar un amplio espectro de manifestaciones. Por ejemplo, pueden generar procesos anaplásicos, cambios en la expresión génica o en el crecimiento celular. Tales daños pueden deberse a procesos metabólicos endógenos que producen ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) alterando directamente al ADN (Tafurt y Marin, 2014; Azurmendi, 2016; Lagunas, 2018).

Existen diferentes maneras de reparar el ADN dependiendo del tipo de daño y de los componentes que se encuentren cercanos, o bien, sean más asequibles. Los mecanismos de reparación se pueden clasificar en aquellos que actúan cuando existe algún daño en una sola cadena y aquellos que participan cuando se dañan ambas. Mientras que algunas lesiones se reparan de forma directa, otras requieren de una serie eventos en los que participan múltiples proteínas. Así, las vías más importantes para reparar los daños en una sola cadena del ADN son la reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés), la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y la reparación por mal apareamiento de las bases (MMR);

mientras que la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación por recombinación homóloga (HR) son más comunes para los daños en ambas cadenas (Altieri *et al.*, 2008; Hang, 2010; Lagunas, 2018).

2.2.1. Ensayo cometa

El ensayo cometa (EC) o electroforesis alcalina de células individuales es una prueba rápida y cuantitativa que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos en cualquier tipo de células eucariotas (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015; Rodríguez-rey *et al.*, 2016). El fundamento del ensayo se basa en la capacidad de los fragmentos de ADN escindidos desnaturalizados para migrar fuera de la célula bajo la influencia de un potencial eléctrico. Además, el ADN superenrollado intacto permanece dentro de los límites de la membrana celular cuando se aplica una corriente durante la electroforesis. La imagen de la migración del ADN obtenida se asemeja a un cometa con cabeza y cola, de ahí el término “ensayo del cometa” (Da Silva *et al.*, 2000; Ayala *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2009).

El ensayo detecta las rupturas de cadena doble y sencilla, formación de sitios alcalinos lábiles y entrecruzamientos de ADN-ADN y ADN-proteínas. Asimismo, se ha aplicado la técnica en la evaluación de los mecanismos de reparación celular ante el daño oxidante en el ADN en células eucariotas. Esto al observar si existe una reducción en las rupturas de cadena sencilla y doble para evaluar si afectaron a los mecanismos de reparación (Lagroye *et al.*, 2004; Collins, 2014).

2.3. Estrés oxidante

Se le considera una oxidación a todos los procesos en los cuales ocurre una pérdida de electrones, una captación de oxígeno o una cesión de hidrogeno. Por otro lado, una reducción es otro proceso en el cual, se realiza una captación de electrones o se “pierden” oxígenos. La relación que tiene la oxidación con la reducción es que siempre tienen que ir acompañados uno del otro. A estos sucesos se les conoce como reacciones óxido-reducción o redox. Estas reacciones terminan siendo de gran importancia ya que los seres vivos obtienen gran parte de su energía libre a partir de ellas (Elejalde, 2001). Sin embargo, el exceso del oxígeno en las células puede terminar siendo nocivo debido a que se pueden generar ERO (átomos o moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en el orbital más externo) lo que ocasiona una reactividad en su estructura. El hecho de tener esta estructura reactiva hace que las ERO intervengan eficazmente en muchos procesos bioquímicos a un nivel celular. Cabe resaltar que su toxicidad se debe a sus características reactivas (Sánchez-Valle, 2013). Por otro lado, para contrarrestar este efecto negativo que las ERO llegan a ocasionar, la célula puede contar con mecanismos de defensa conocidos como “sistema antioxidante”. Este se encarga de mantener el equilibrio de las reacciones redox y sobrevivencia celular. En un estado normal de cualquier organismo existe un equilibrio entre las ERO y los sistemas de defensa antioxidantes. Sin embargo, cuando se pierde este balance y el estado de oxidación supera a la reacción de los sistemas de defensa, se puede hablar de un estado de estrés oxidante y, posteriormente dar pauta a diferentes tipos de patologías (gástricas, cardíacas, respiratorias, óseas o multiorgánicas entre otras) (Yoshikawa y Naito, 2002; Corrales y Muñoz, 2012; Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

Por lo tanto, el estrés oxidante se puede definir como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, lo que lleva a una interrupción de la

señalización y control redox, que puede provocar daño oxidante a las macromoléculas y alterar los procesos celulares (Jones, 2006; Sies, 2018).

2.4. Metales pesados como agentes inductores de estrés oxidante

Los metales pesados son, generalmente, elementos químicos propios de la naturaleza, sin embargo, existen otros que son de origen antropogénico (actividades industriales, agrícolas, mineras y ganaderas). Estos se caracterizan por poseer un peso molecular alto y suelen ser muy difundidos, además de tener un papel importante en los organismos ya que son parte fundamental de sus funciones bioquímicas y fisiológicas (Calva y Torres, 2004; Ferré *et al.*, 2007; Navarro-Aviñó *et al.*, 2007). Los metales pesados sin alguna actividad biológica se les conoce como “no esenciales” (Calva y Torres, 2004; Lee *et al.*, 2012; Tchounwou *et al.*, 2012).

La toxicidad de los metales pesados se debe a su capacidad de bioacumularse y a la facilidad con que reaccionan con moléculas orgánicas, específicamente con sus grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. Además, el nivel de toxicidad de estos depende de las vías de exposición, las dosis y la naturaleza química del metal, entre otros (Morais y Pereir, 2012; Zarei *et al.*, 2013; Londoño *et al.*, 2016; Rodríguez, 2017). Los efectos tóxicos en sistemas biológicos dependen de reacciones con ligandos que son esenciales para su asimilación, y estos ligandos están presentes en gran abundancia en la célula, ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones o como moléculas aisladas. El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula, destacando la catálisis de reacciones de generación de moléculas ERO o radicales libres (RL) que generan estrés oxidante (Calva y Torres, 2004; Ferré *et al.*, 2007; Navarro-Aviñó *et al.*, 2007;). Si bien, la generación de ERO inducida por fuentes endógenas está relacionada con el metabolismo normal, las fuentes exógenas, en especial los metales pesados, no solo producen ERO directamente y/o estimulan la generación de estos por fuentes endógenas, sino que también tienen efectos tóxicos y

propiedades cancerígenas (Lee *et al.*, 2012). Particularmente, los metales como el Cromo (Cr) desempeñan un papel fundamental en la generación de ERO y EOX en sistemas biológicos (Matés *et al.*, 2010; Jomova y Valko, 2011).

El Cr tiene varios estados de oxidación que van desde el Cr(II) al Cr(VI) donde las especies más estables y frecuentes son el Cr(III) y el Cr(VI) (Cuberos *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2011; Lejding *et al.*, 2018). En su forma trivalente [Cr(III)] es indispensable en el metabolismo de la glucosa, colesterol, ácidos grasos y cristalino, involucrado en otros múltiples procesos biológicos (Cuberos *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2011). En contraparte, el Cr(VI), además de ser el segundo estado más “estable”, se sabe que es el estado más dañino, siendo 100 veces más tóxica debido a su solubilidad y fácil penetración al interior de las células, en comparación con las sales de Cr(III), las cuales son insolubles y de difícil ingreso (Netzahuatl-Muñoz *et al.*, 2010; OEHHA, 2016). Además, los compuestos de Cr(VI) son definidos como contaminantes tóxicos que están clasificados como carcinógenos humanos por varias agencias reguladoras como la EPA o la IARC (IARC, 1990; EPA, 2010). El peligro para la salud asociado con la exposición al Cr depende de su estado de oxidación, que va desde la baja toxicidad de la forma metálica hasta la alta toxicidad del Cr(VI) (Lee *et al.*, 2012; OEHHA, 2016; Tchounwou *et al.*, 2012).

2.5. Antioxidantes

En el cuerpo existen diferentes maneras para contrarrestar el posible efecto negativo de las ERO y ERN: los antioxidantes. Estos son sustancias capaces de ralentizar la tasa de oxidación de otras moléculas, contrarrestando a los RL previniendo el daño que estos provocan y, de esta manera, la aparición de enfermedades. Pueden reducir en gran medida el daño adverso debido a oxidantes neutralizándolos antes de que reaccionen con objetivos biológicos, previniendo reacciones en cadena o evitando la activación de oxígeno a productos altamente

reactivos (Ratnam *et al.*, 2006; Flora, 2009; Orsine *et al.*, 2014; Ayala-Mata *et al.*, 2019). En el caso de los metales pesados, un antioxidante puede proteger contra su toxicidad atrapando los RL, terminando así la reacción en cadena, quelando el ion metálico y previniendo la reacción con las ERO o quelando el metal y manteniéndolo en un estado redox (Flora, 2009). De esta manera, se ha observado que la acción de algunos antioxidantes como los polifenoles, además de comprender la captura de las ERO, también previene su formación e inhibe su propagación (González-Torres *et al.*, 2000; Zhang y Tsao, 2016).

2.5.1. Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos. Además, son un tipo de antioxidantes de origen exógeno adquiridos mediante la dieta y que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Un fenol es un grupo hidroxilo ligado a un grupo fenilo, ahora, si un grupo fenilo tiene más de un hidroxilo se le llama polifenol (Ayala-Mata *et al.*, 2019). En la actualidad se conocen las propiedades biológicas de los polifenoles, así como de sus efectos. Estos son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas o antilipémicas entre otras. Los polifenoles, como antioxidantes, son en realidad los principales de la dieta y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C, y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides. Se sabe que algunos alimentos, como el vino, el cacao o el té verde destacan por su alto contenido en polifenoles. De hecho, los polifenoles contenidos en estos alimentos son altamente efectivos como defensa antioxidante, por ejemplo, los polifenoles del té verde muestran una fuerte capacidad antioxidante *in vitro*, y su efecto es hasta 5 veces más efectivo que el de la vitamina C o la vitamina E

(Valenzuela, 2004; Quiñones *et al.*, 2012). Incluso, en estudios previos en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que los extractos polifenólicos del té verde tales como la (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) o el polyphenon 60® (P60), no solo tienen propiedades como agentes antioxidantes, sino que también pueden reducir el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI) (García-Rodríguez *et al.*, 2013, 2014, 2016). Debido a lo anteriormente mencionado, las plantas medicinales son candidatas para la quimio prevención del cáncer ya que pueden poseer estos agentes quimiopreventivos con efectos inhibidores sobre el inicio, promoción y progresión de la carcinogénesis (Nogueira *et al.*, 2006).

Si después de la acción de los antioxidantes el daño genotóxico termina persistiendo, el último nivel de protección de la célula consiste en la reparación de las lesiones. Lo que reside en la actividad de enzimas que repararán el daño inducido por los RL al ADN, y de otras que destruirán las proteínas dañadas por los RL o las que removerán los ácidos grasos oxidados de las membranas (González-Torres *et al.*, 2000).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición ocupacional y ambiental a metales pesados representan un riesgo para la salud de la población. En particular a los compuestos de Cr(VI) se les ha asociado con el desarrollo de enfermedades relacionadas con el daño al ADN, como lo son algunos tipos de cáncer. En contraparte, se ha observado que los polifenoles del té verde pueden proteger del daño genotóxico inducido por el Cr(VI) proponiéndose como una de las vías de protección la activación de los mecanismos de reparación del daño al ADN. De ahí que, en el presente estudio se exploró si los extractos polifenólicos del té verde presentan efectos sobre la reparación del daño al ADN inducido por Cr(VI), mediante la evaluación de las rupturas de cadena sencilla y doble del ADN evaluadas en diferentes tiempos.

4. HIPOTESIS

Si los compuestos de Cr(VI) son capaces de inducir daño genotóxico mediante la generación de estrés oxidante durante su reducción intracelular a Cr(III) y se ha observado que algunos polifenoles del té verde son capaces de contrarrestar su daño genotóxico, además de que se ha reportado que pueden activar enzimas de reparación como la 8-oxoguanina glicosilasa 1 (OGG1), entonces se espera que la administración de los extractos polifenólicos del té verde en ratones expuestos a Cr(VI), disminuyan los rompimientos de cadena sencilla y doble del ADN después de las 4 h, y que reestablezcan los valores normales a las 48 y 72 h.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Estudiar el efecto de los extractos polifenólicos del té verde sobre la reparación del daño al ADN en ratones Hsd:ICR tratados con compuestos de Cr(VI).

5.2. Particulares

- Evaluar el efecto de los extractos polifenólicos del té verde sobre el daño genotóxico inducido por el CrO₃ mediante el ensayo de MN.
- Evaluar el efecto de los extractos polifenólicos del té verde sobre el daño citotóxico inducido por CrO₃ mediante la relación de EPC/ENC.
- Evaluar el efecto de los extractos polifenólicos del té verde sobre las rupturas de cadena sencilla y doble del ADN inducidas por CrO₃ a intervalos de tiempo de 0, 4, 24 48 y 72 h mediante el ensayo cometa.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Animales

Los animales de experimentación (ratones Hsd:ICR) se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, los cuales estuvieron bajo las siguientes condiciones controladas:

- Temperatura y humedad ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$).
- Periodo de luz-obscuridad 12-12 h.
- Alimentación de nutricubos (Harlan®).
- Agua *ad libitum*.

Se siguieron los criterios de evaluación y condiciones establecidas por la EPA, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) y la Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration, FDA) (EPA, 1998; Heddle *et al.*, 1983; Mavournin *et al.*, 1990; OECD, 1997). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de bioética de la “Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM” (Código: FESZ-CE/21-118-13).

6.2. Reactivos

Los reactivos empleados en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Se emplearon: Naranja de Acridina (NA) [CAS No. 10127-02-3], Bromuro de Etidio (BrEt) [CAS No. 1239-45-8], Trióxido de cromo (CrO_3) [CAS No. 1333-82-0], agarosa punto de fusión normal [CAS9012-36-6], agarosa bajo punto de fusión [CAS No. 9012-36-6], NaCl [CAS No. 7647-14-5], NaOH [CAS No. 1310-73-2], HCl [CAS No. 7647-01-0], EDTA [CAS No. 60-00-4], DMSO [CAS No. 67-68-5], Tritón X-100 [CAS No. 9002-93-1], Trizma Base [CAS No. 77-86-1], PBS, etanol

[CAS No. 64-17-5] y extractos de polifenoles de té verde, Polyphenon60® [P60, CAS N° 138988-88-2] con un contenido total de catequinas de $\geq 60\%$.

6.3. Tratamientos y dosis

Los extractos polifenólicos del té verde y el CrO_3 se prepararon mediante su disolución en agua destilada estéril. La administración se realizó inmediatamente en un volumen aproximado de 0.25 mL por ratón.

Los grupos experimentales fueron conformados por cinco ratones macho de 2 a 3 meses de edad, con un peso variable entre 28-34 g de la cepa Hsd:ICR, y fueron divididos en: a) grupo testigo, al cual se le trató únicamente con el vehículo (agua destilada estéril); b) grupo P60, tratado con dosis de 30 mg/kg de extractos polifenólicos del té verde por vía intragástrica (i.g.); c) grupo Cr(VI), al que se le administró una dosis de 20 mg/kg de CrO_3 por vía intraperitoneal (i.p.) y d) grupo experimental, al que se le administró extractos polifenólicos del té verde por vía i.g. 4 h previo al tratamiento de CrO_3 vía i.p.

Las dosis fueron establecidas de acuerdo con investigaciones previas donde el compuesto de CrO_3 induce daño genotóxico sin provocar la muerte de los organismos y la dosis de extractos polifenólicos del té verde no genera daño genotóxico ni citotóxico (García-Rodríguez *et al.*, 2001, 2012, 2013; O'Brien *et al.*, 2003).

Las evaluaciones se realizaron en muestras de sangre periférica tomadas a las 0, 4, 24, 48 y 72 h (Figura 1).

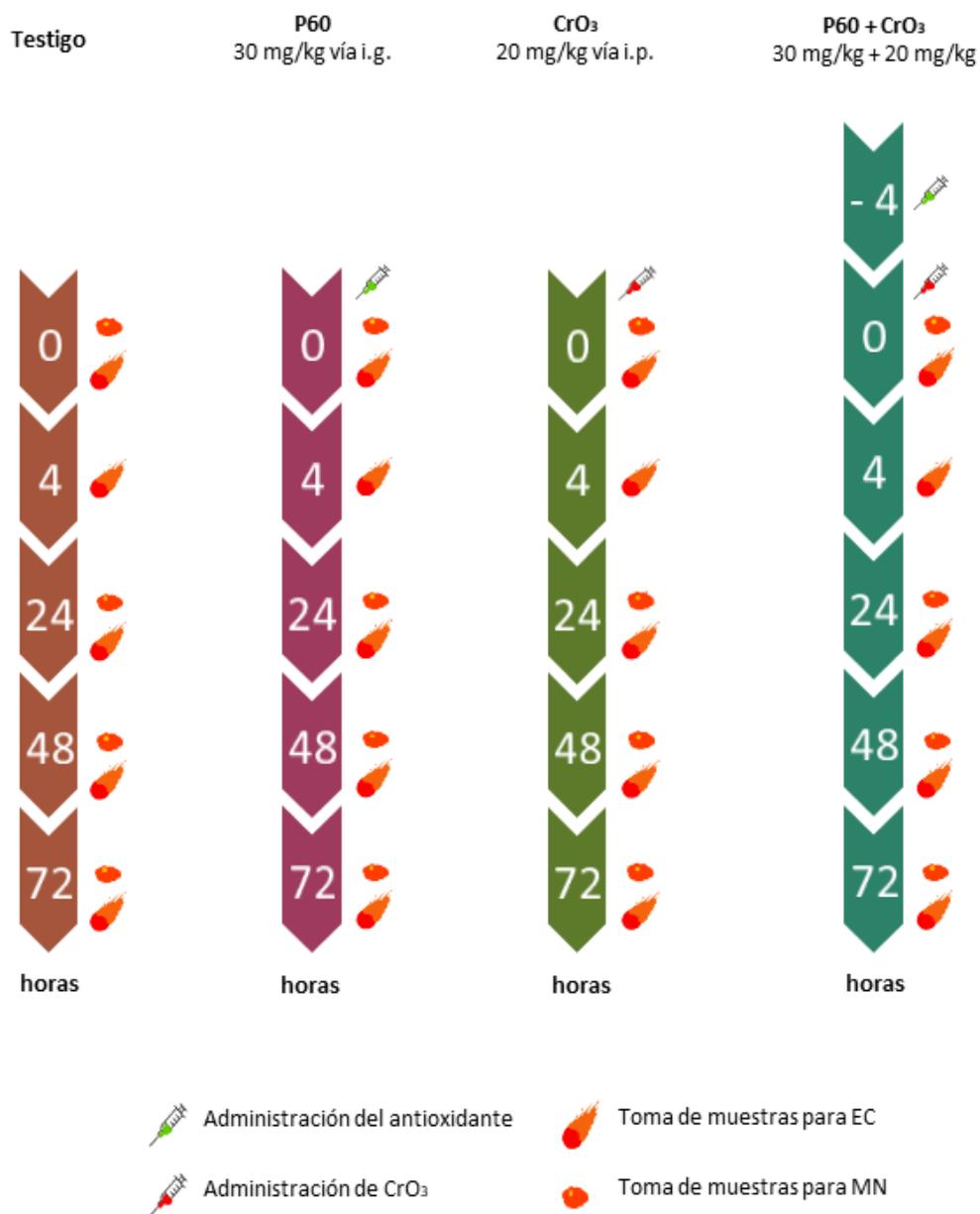


Figura 1. Protocolo para la administración de los tratamientos y toma de muestras. CrO₃, trióxido de cromo. P60, extractos polifenólicos del té verde. P60+CrO₃, extractos polifenólicos del té verde y trióxido de cromo. EC, ensayo cometa. MN, ensayo de micronúcleos.

6.4. Ensayo de micronúcleos

La evaluación de MN se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Hayashi *et al.* (1990). Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas de la vena caudal de los animales y estas fueron colocadas sobre laminillas previamente tratadas con naranja de acridina (NA) y se observaron en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión de luz, 24 h después de su preparación. La tinción de los eritrocitos con NA, permite diferenciar a los eritrocitos normocromáticos (ENC) de los eritrocitos policromáticos (EPC), ya que estos últimos al seguir presentando ARN-ribosomal, el colorante los tiñe de color rojo. Con esta técnica es posible identificar la presencia de MN, ya que el ADN es teñido de color amarillo. Para la evaluación del daño genotóxico se cuantificaron los EPC con presencia de MN (EPC-MN) que hay en 4,000 EPC por ratón y para la evaluación de daño citotóxico, la frecuencia de EPC que se encuentren en 2,000 eritrocitos totales (EPC/ ENC).

6.5. Ensayo cometa

El EC se realizó de acuerdo con Singh *et al.* (1988) y Dhawan *et al.* (2007) para detectar los rompimientos de cadena sencilla y doble, así como si existe reparación del ADN.

Por cada ratón se tomaron dos muestras de sangre (10 µl) de la vena caudal a las 0, 4, 24, 48 y 72 h después de la administración de los tratamientos; estas se suspendieron en agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y se colocaron sobre portaobjetos previamente tratados con agarosa de punto de fusión normal (0.7%). Posteriormente, se les agregó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y se colocaron en una solución de lisis durante 24 h a 4° C. Después de la lisis, las muestras se incubaron en la cámara de electroforesis con una solución amortiguadora alcalina durante 20 minutos. Posteriormente, la electroforesis se

realizó a 300 mA y 25 V por otros 20 minutos. Al finalizar, se les realizó un lavado a las laminillas con una solución amortiguadora de neutralización durante 15 min y se les fijó con alcohol etílico al 70% (por 5 min).

Los geles se tiñeron con 75 μ L de una solución de BrEt para la observación de los "cometas". Las evaluaciones se realizaron con un ocular graduado (reglilla), bajo un microscopio de fluorescencia *Nikon Optiphot-2* (filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm). Se evaluaron 300 células por ratón y se obtuvo la frecuencia de cometas, además de medir la longitud de cada uno para sacar el porcentaje de ADN en la cauda. La magnitud del daño en el ADN fue expresada por la frecuencia de cometas, el porcentaje de ADN en la cauda y las unidades arbitrarias (UA) de acuerdo con Collins (2004). Las UA fueron medidas de tal forma que, el número de cometas observados se multiplicó por la clasificación de estos.

6.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del ensayo de MN y EC se presentaron como promedio \pm error estándar (E.E.) y se les aplicó un análisis de varianzas (ANOVA) seguido de una prueba Tukey, de acuerdo con la homogeneidad de varianzas. Para la inducción de MN se calculó la Frecuencia de MN. La realización de los análisis fue mediante el programa GraphPad. Para todos los casos, se tomaron los datos con una $p < 0.05$ como significativos estadísticamente (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001).

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación de micronúcleos

En la figura 2 se muestran los eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con NA. Los ENC son aquellos sin tinción (en color negro) (figura 3-a) mientras que, los EPC se ven teñidos de un color naranja (figura 3-b) y los MN se tiñen de color amarillo fluorescente (figura 3-c).

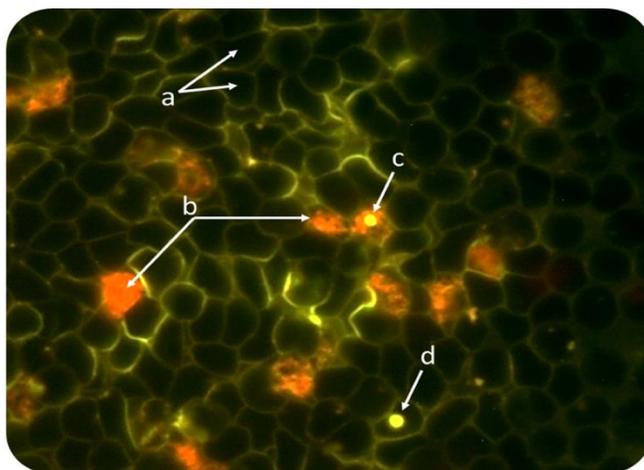


Figura 2. Eritrocitos de sangre periférica de ratón teñidos con NA, naranja de acridina. a) ENC, Eritrocitos normocromáticos; b) EPC, eritrocitos policromáticos; c) EPC-MN, eritrocito policromático con micronúcleo; d) ENC-MN, eritrocito normocromático con micronúcleo.

En la figura 3 se muestran los promedios de MN para el grupo testigo, extractos polifenólicos del té verde, CrO_3 y el tratado con P60 y CrO_3 (P60+ CrO_3) evaluados a las 0, 24, 48 y 72 h. El tratamiento por sí solo de extractos polifenólicos del té verde no incrementó los promedios de MN, mientras que el de CrO_3 los aumentó significativamente a partir de las 24 h, mostrando un mayor efecto a las 48 h en comparación con el testigo. En el tratamiento P60+ CrO_3 se disminuyeron los MN de manera significativa en comparación con el de CrO_3 (76, 56 y 46% a las 24, 48 y 72 h, respectivamente), sin embargo, los MN aún resultan significativos al compararse con el grupo testigo a las 48 y 72 h.

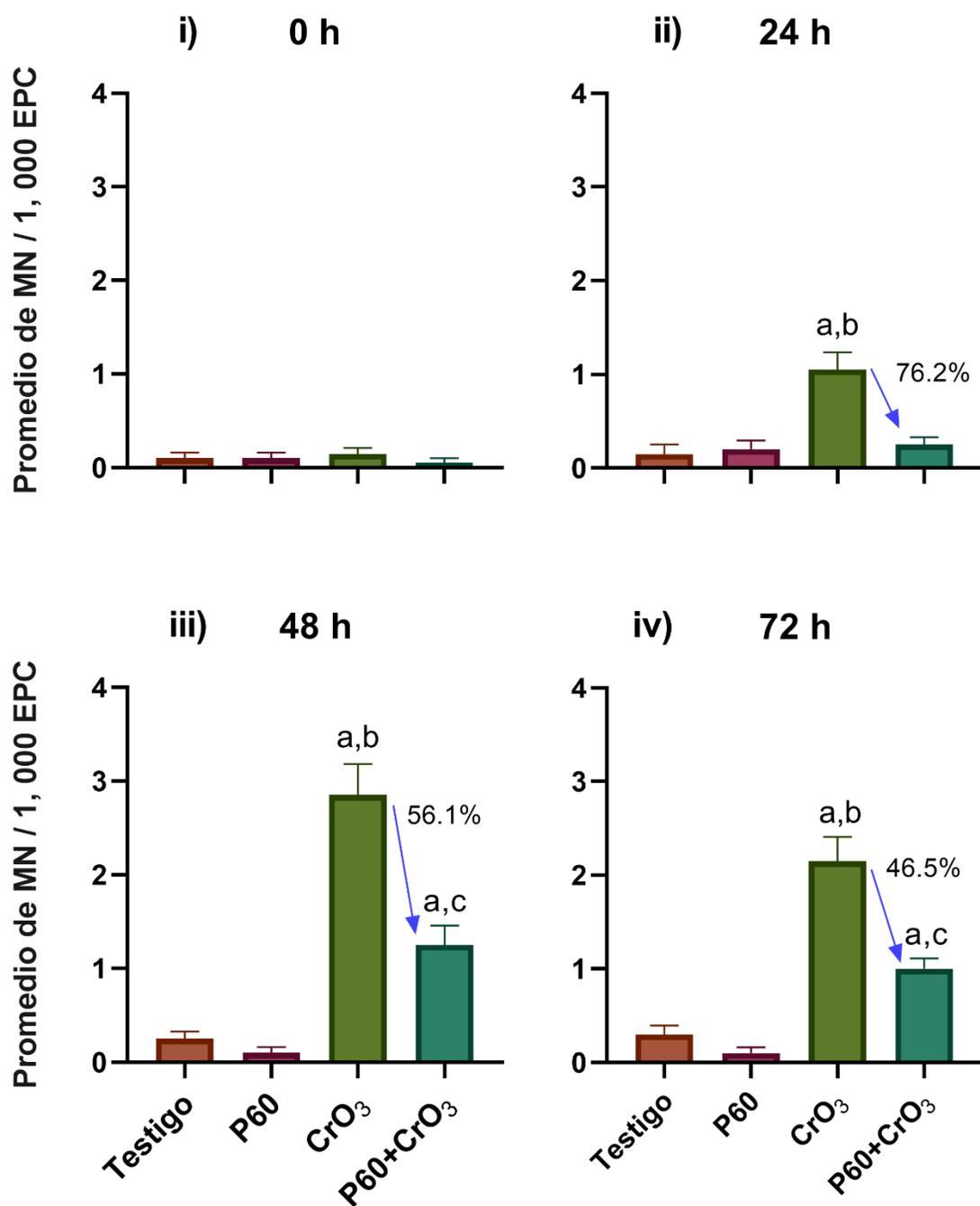


Figura 3. Análisis del promedio de micronúcleos calculado por tratamiento en 1,000 EPC: i) 0 h, ii) 24 h, iii) 48 h, iv) 72 h. Significancia estadística $p < 0.05$, ^ap: vs. testigo; ^bp: vs. P60+CrO₃; ^cp: vs. P60. EPC, eritrocitos policromáticos. P60, extractos polifenólicos del té verde. CrO₃, trióxido de cromo. P60+CrO₃, extractos polifenólicos del té verde y trióxido de cromo.

7.2. Evaluación de ensayo cometa

En la figura 4 se muestran imágenes de cometas, en donde se muestra la clasificación de los niveles de daño en el ADN propuesto por Collins (2004): (a) nivel 0, los cometas no presentan cauda o apenas es visible (<5% de ADN en la cauda) (figura 4a); (b) nivel 1, los cometas presentan una cauda fácil de identificar (5-10% de ADN en la cauda) (figura 4b-i); nivel 2, los cometas presentan una cauda extensa, además, se observa una mayor intensidad de la tinción al inicio de la cauda (11–40% de ADN en la cauda) (figura 4b-ii); nivel 3, los cometas presentan una mayor extensión de la cauda en comparación de los niveles anteriores y la intensidad es distribuida a lo largo de la cauda (41–95% de ADN en la cauda) (figura 4b-iii); y nivel 4, los cometas presentan una cauda pronunciada en cuanto a extensión e intensidad (>95% de ADN en la cauda) (figura 4b-iv).

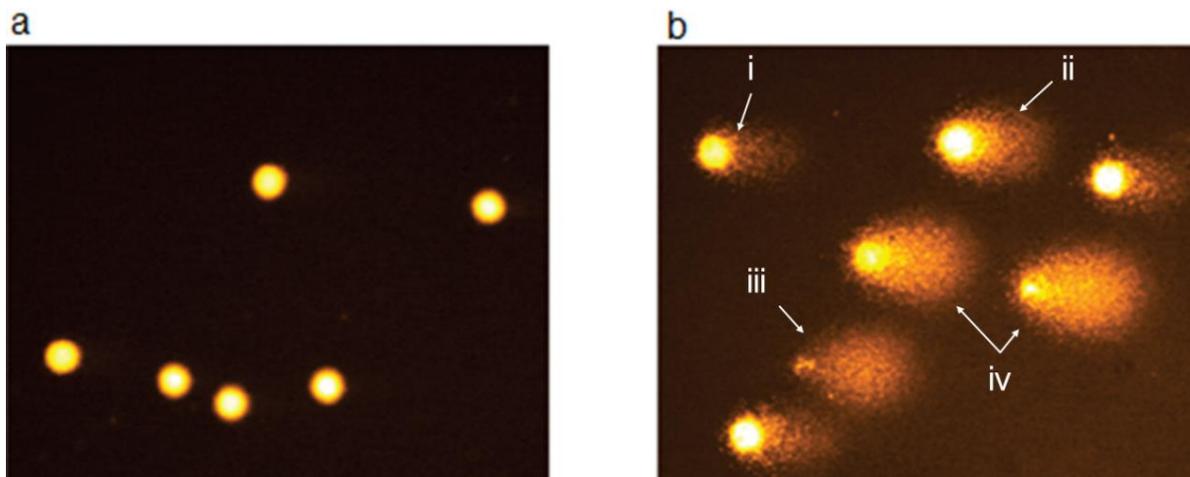


Figura 4. Imágenes de cometas que representan los diferentes niveles de daño al ADN: a) nivel 0; b) nivel 1 (i), nivel 2 (ii), nivel 3 (iii) y nivel 4 (iv) (editada de Wong et al., 2005).

En la figura 5, se muestran los promedios de las frecuencias de los cometas observados en 300 núcleos y que fueron evaluados a las 0, 4, 24, 48 y 72 h en los grupos testigo, extractos polifenólicos del té verde, CrO₃ y P60+CrO₃. Las frecuencias de los cometas en el grupo tratado solo con los extractos polifenólicos del té verde fueron similares a las observadas en el grupo testigo. Mientras que, en el grupo tratado con CrO₃, estas aumentaron a partir de las 4 h y presentaron el mayor efecto a las 24 y 48 h, sin embargo, estos incrementos no resultaron significativos. Cuando se combinaron los tratamientos de los extractos polifenólicos del té verde y CrO₃ (P60+CrO₃), se observó una reducción en la frecuencia de los cometas al compararse con la observada con el tratamiento solo del CrO₃.

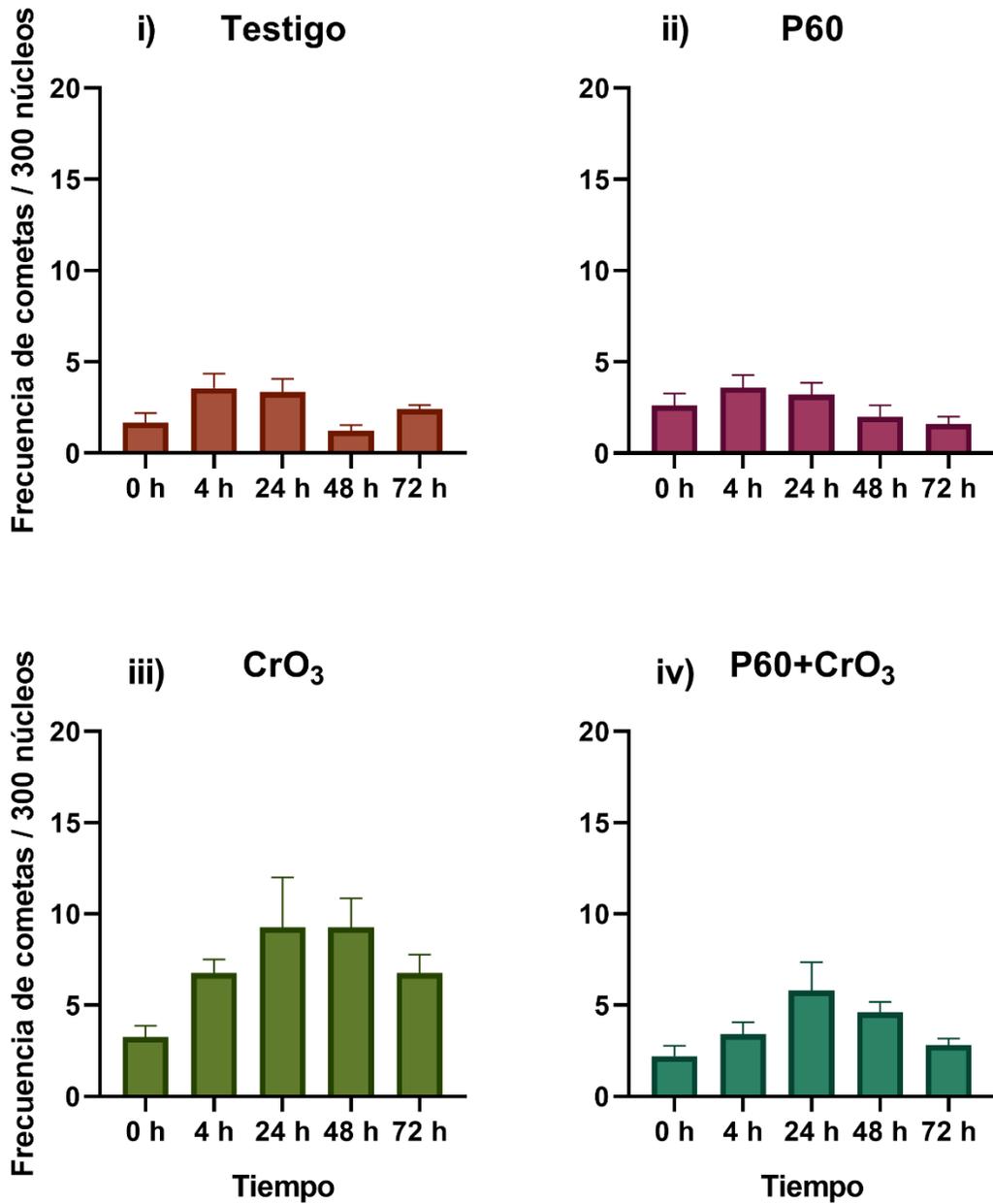


Figura 5. Análisis de la frecuencia de cometas presentes en 300 núcleos evaluados a los distintos tiempos por tratamiento: i) Testigo, ii) P60, iii) CrO₃, iv) P60+CrO₃. P60, extractos polifenólicos del té verde. CrO₃, trióxido de cromo. P60+CrO₃, extractos polifenólicos del té verde y trióxido de cromo.

El promedio de los porcentajes de ADN en las caudas de los cometas se midió de forma individual mediante la longitud del núcleo, la cauda y la longitud total del cometa (la longitud de la cauda se dividió entre la longitud total multiplicado por 100). En la figura 6 se muestran los promedios de los porcentajes de ADN en las caudas evaluados a las 0, 4, 24, 48 y 72 h en los grupos testigo, extractos polifenólicos del té verde, CrO₃ y P60+CrO₃. En el grupo tratado con los extractos polifenólicos del té verde no hubo efectos significativos comparados con el grupo testigo. Mientras que, en el grupo tratado con CrO₃ los porcentajes de ADN aumentaron a partir de las 4 h de forma significativa, presentando el mayor efecto a las 24 h. Aunque el comportamiento de los porcentajes de ADN es similar entre el grupo tratado solo con CrO₃ y el P60+CrO₃, se observó una disminución significativa entre las 24 y 48 h en los porcentajes de ADN del grupo P60+CrO₃.

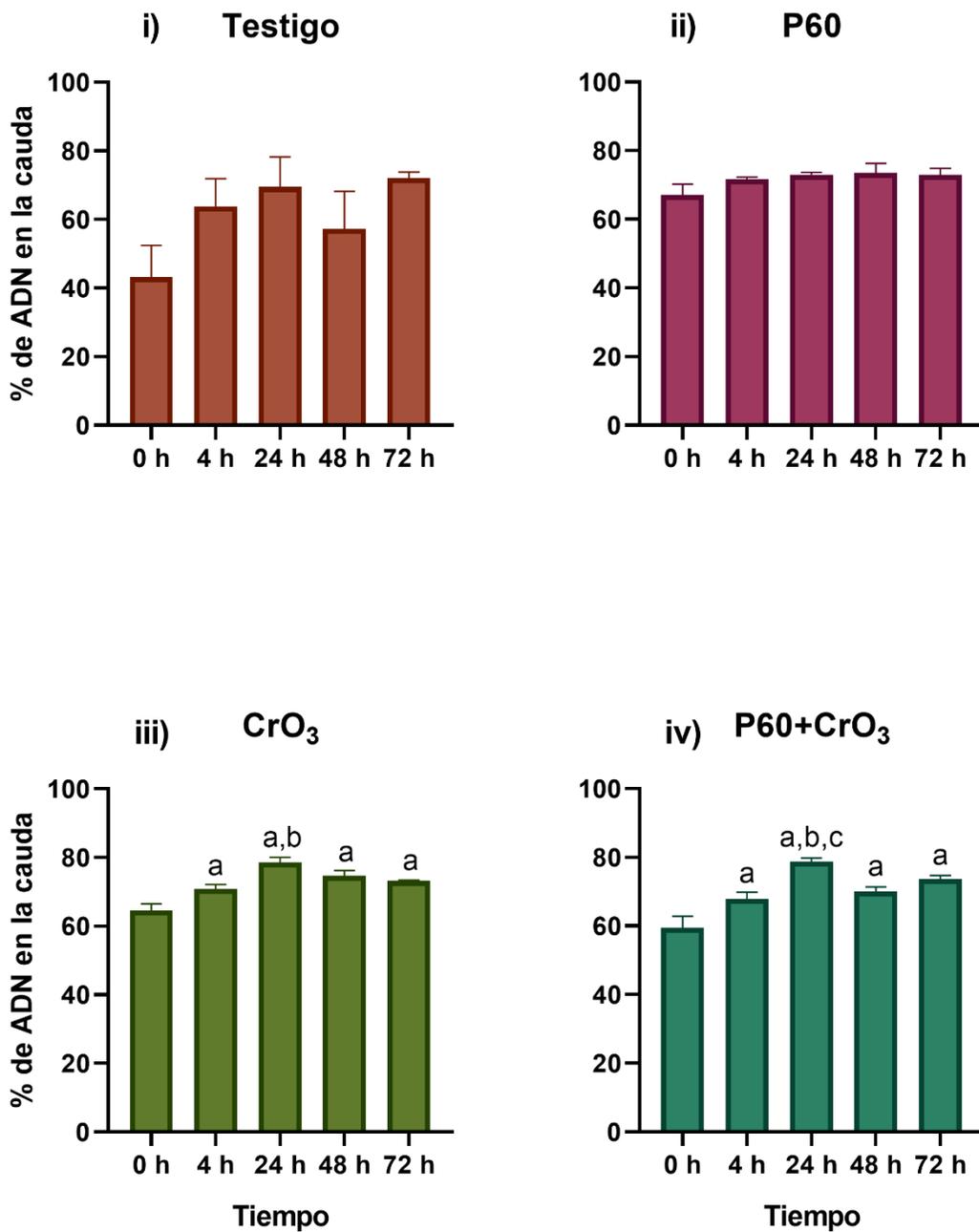


Figura 6. Análisis del promedio del porcentaje de ADN en la cauda calculado en los cometas presentes en los distintos tiempos evaluados por tratamiento: i) Testigo, ii) P60, iii) CrO₃, iv) P60+CrO₃. Significancia estadística $p < 0.05$, ^ap: vs. 0 h; ^bp: vs. 4 h; ^cp: vs. 48 h. P60, extractos polifenólicos del té verde. CrO₃, trióxido de cromo. P60+CrO₃, extractos polifenólicos del té verde y trióxido de cromo.

Debido a que la frecuencia de cometas y el porcentaje de ADN en la cauda evalúan de manera particular cada una de las características de los cometas, se optó por evaluar las UA. Estas consisten en medir la magnitud del daño en el ADN clasificándolo mediante niveles dependiendo del promedio del porcentaje de ADN en las caudas y multiplicándolo por el total de cometas observados. Gracias a este cálculo se pueden obtener resultados más claros acerca de los efectos sobre los rompimientos de cadena doble y sencilla de ADN. En la figura 7 se muestran los promedios de las UA presentes en los grupos testigo, extractos polifenólicos del té verde, CrO₃ y P60+CrO₃ a las 0, 4, 24, 48 y 72 h. En el grupo tratado solo con los extractos polifenólicos del té verde, no se observaron efectos significativos sobre las UA en comparación con el grupo testigo. Mientras que, en el grupo tratado con CrO₃ se incrementó este parámetro a partir de las 4 h siendo significativo a las 48 y 72 h comparado con el grupo testigo y con el grupo P60+CrO₃ (72 h). En el grupo tratado con extractos polifenólicos del té verde y con el CrO₃ se disminuyeron las UA a partir de las 4 h.

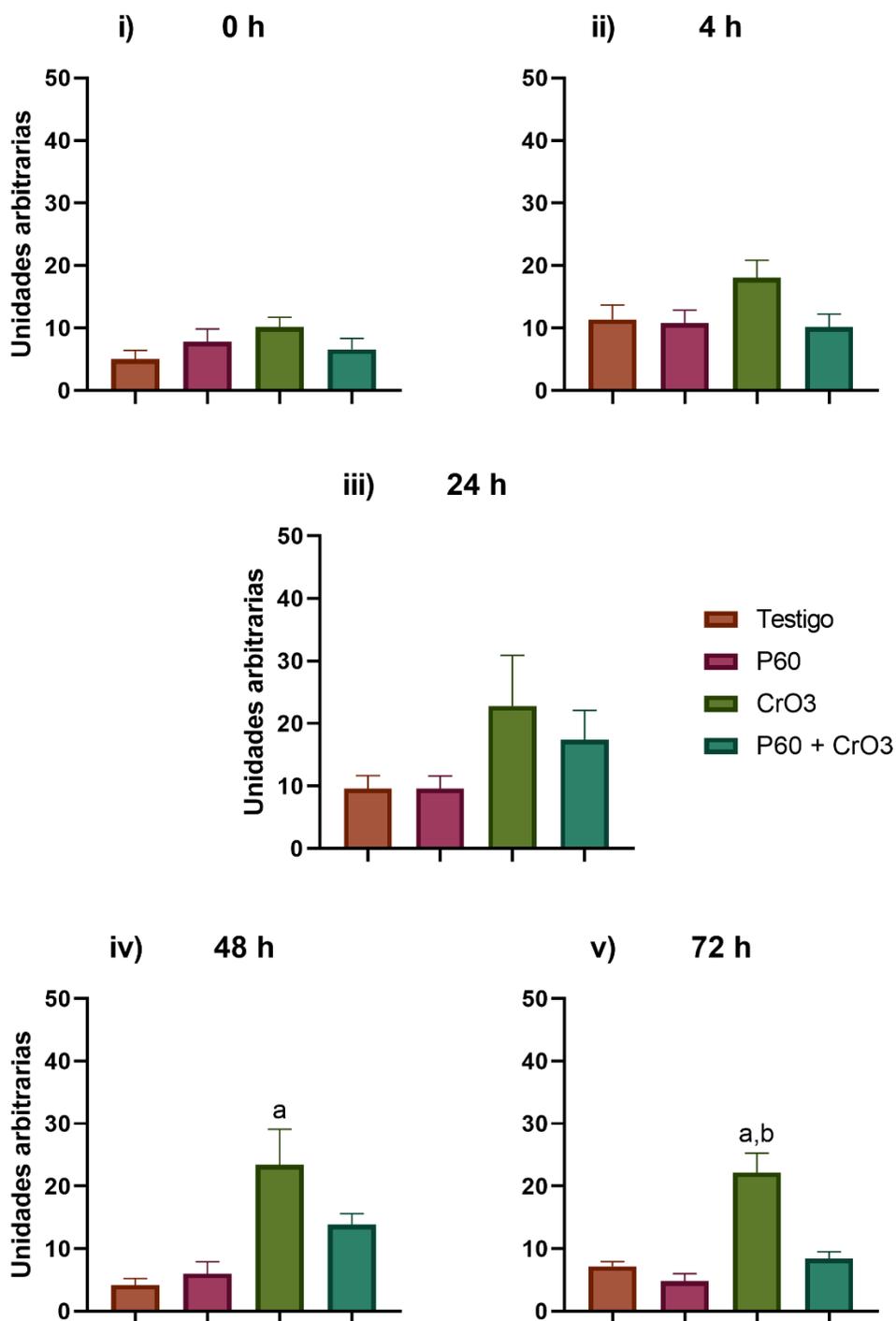


Figura 7. Análisis del promedio de las unidades arbitrarias calculadas en 300 núcleos presentes por grupo en los distintos tiempos de evaluación: i) 0 h, ii) 4 h, iii) 24 h, iv) 48 h, v) 72 h. Significancia estadística $p < 0.05$, ^ap: vs. Testigo; ^bp: vs. P60+CrO₃. P60, extractos polifenólicos del té verde. CrO₃, trióxido de cromo. P60+CrO₃, extractos polifenólicos del té verde y trióxido de cromo.

7.3. Relación EPC/ENC

En el cuadro 3 se muestran los promedios de la relación de EPC/ENC evaluados en el grupo testigo, extractos polifenólicos del té verde, CrO₃ y P60+CrO₃ a las 0, 24, 48 y 72 h. En el grupo tratado con los extractos polifenólicos del té verde no se observaron efectos en la relación entre los EPC y ENC. Mientras que, en el grupo de CrO₃ se incrementó significativamente a partir de las 48 h en comparación con su propia hora 0. Asimismo, a las 72 h de este grupo, se presentó un incremento en comparación con el grupo testigo a la misma hora y a las 72 h del grupo P60+CrO₃. En el grupo P60+CrO₃ se incrementó significativamente la relación entre los EPC y ENC a partir de las 48 h en comparación con su propia hora 0.

Cuadro 3. Promedios de la relación EPC/ENC en 1,000 células totales en sangre periférica de ratones tratados con P60, CrO₃, y P60+CrO₃.

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	HORA	n	EPC/1,000 ENC (x ± E.E.)	ANOVA
Testigo	0	0	5	57.2 ± 8.7	
		24	5	52.3 ± 2.1	
		48	5	56.7 ± 4.6	
		72	5	66.9 ± 5.5	
P60	30	0	5	44.3 ± 2.8	
		24	5	51.2 ± 4.0	
		48	5	51.3 ± 3.4	
		72	5	53.5 ± 3.2	
CrO₃	20	0	5	48.0 ± 7.7	
		24	5	57.4 ± 7.5	
		48	5	68.6 ± 5.8	b
		72	5	87.4 ± 5.8	a, b, c
P60+CrO₃	30 + 20	0	5	45.5 ± 4.8	
		24	5	46.8 ± 6.4	
		48	5	61.2 ± 8.6	d
		72	5	60.9 ± 6.9	d

$p < 0.05$, ^ap: vs. Testigo 72 h; ^bp: vs. CrO₃ 0 h; ^cp: vs. P60+CrO₃ 72 h; ^dp: vs. P60+CrO₃ 0 h. P60, extractos polifenólicos del té verde. CrO₃, trióxido de cromo. P60+CrO₃, extractos polifenólicos del té verde y trióxido de cromo. EPC, eritrocitos normocromáticos. ENC, eritrocitos policromáticos.

8. DISCUSIÓN

Se ha observado que antioxidantes como los polifenoles son capaces de reducir el daño genotóxico inducido por compuestos de Cr(VI) (González-Torres *et al.*, 2000; García-Rodríguez *et al.*, 2013; García-Rodríguez, 2019). Aunque, se ha sugerido a la reparación del daño al ADN como una de las vías de eliminación del daño oxidativo en el ADN, no hay estudios con extractos polifenólicos del té verde y compuestos del Cr(VI). En el presente estudio, el tratamiento con los extractos polifenólicos del té verde disminuyó los rompimientos de cadena sencilla y doble a partir de las 4 h después del tratamiento con Cr(VI), sugiriendo que estos extractos podrían activar la reparación del ADN y disminuir el daño genotóxico inducido por el Cr(VI).

En las evaluaciones del daño genotóxico empleando el ensayo de MN y el EC, los extractos polifenólicos del té verde por si solos no aumentaron las frecuencias de MN ni las rupturas de cadena sencilla y doble del ADN. En estudios previos, se ha mostrado que la administración *vía i.g.* de estos mismos extractos y de la EGCG extraída de hojas del té verde, no inducen MN en células de medula ósea y sangre periférica de ratones de las cepas CD-1 y NMR1 (Isbrucker *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2011; García-Rodríguez *et al.*, 2013). Mientras que, la genotoxicidad de los compuestos de Cr(VI) fue corroborada mediante el incremento de los MN y los rompimientos de cadena sencilla y doble en el grupo tratado con 20 mg/kg de CrO₃. Estos resultados concuerdan con estudios previos en nuestro laboratorio, en donde dosis similares de CrO₃ incrementaron los MN en ratones de la cepa CD-1 (García-Rodríguez *et al.*, 2001; Nicolás-Méndez *et al.*, 2022). También, en otros estudios se ha observado que el daño generado por los compuestos de Cr(VI) (rupturas de cadena sencilla y doble del ADN, así como los sitios álcali lábiles) aumenta en linfocitos de sangre periférica de humanos y células de intestino medio de larvas de *Drosophila melanogaster*. Esto al evaluar el daño al ADN mediante el EC a distintos

intervalos de tiempo (30, 60 y 120 min en el caso de linfocitos; y 24 y 48 h en el caso de células de intestino medio de larvas de *Drosophila melanogaster*) (Blasiak y Kowalik, 2000; Trzeciak *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2013).

El daño genotóxico de los compuestos de Cr(VI) ha sido ampliamente reportado en diferentes ensayos de prueba (O'Brien *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2019). Una vía por la cual el Cr(VI) causa estos daños es mediante los estados intermediarios del cromo y las ERO generadas durante su reducción intracelular a su forma trivalente (Shi y Dalal, 1992; Jomova y Valko, 2011). El radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) puede interactuar con biomoléculas como el ADN generando aductos (como el 8-hidroxidesoxiguanosina [8-OHdG]), sitios alcalinos lábiles y entrecruzamientos de ADN-ADN y ADN-proteínas, que pueden generar rupturas de cadena sencilla y doble del ADN. En el presente estudio, se observó un aumento en las frecuencias de cometas, los porcentajes de ADN en las caudas y en las UA a partir de las 4 h en el grupo tratado con CrO_3 . Este daño temprano al ADN y su persistencia, indica que la exposición al Cr(VI) causa un daño directo al ADN, el cual, puede estar relacionado con la inhibición de los mecanismos de reparación. Una de las vías por las cuales el Cr(VI) puede inhibir estos mecanismos, es mediante la inactivación de enzimas clave en la reparación del ADN, tales como la OGG1 y la XRCC1, lo que puede llevar a la acumulación de lesiones de ADN no reparadas, y, por lo tanto, aumentar el riesgo de mutaciones (O'Brien *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012; DesMarias y Costa, 2019). Particularmente, la enzima OGG1 está involucrada en la reparación por escisión de bases al eliminar el aducto 8-OHdG, resultante de la acción de ERO (Andreassi *et al.*, 2009). Se ha observado que el Cr(VI) incrementa el daño al ADN mediante el aumento del aducto 8-OHdG y la inhibición de la enzima OGG1. Particularmente, en un estudio *in vivo* en muestras de sangre de personas expuestas ocupacionalmente a compuestos de Cr(VI) (trabajadores de galvanoplastia) se muestra que, la exposición al Cr(VI) aumenta los niveles de este metal en la sangre y la orina, además incrementa las rupturas de cadena sencilla y doble del ADN (9.64%) e inhibe la reparación del daño al ADN mediante la

disminución de la expresión del ARNm de hOGG1 (enzima homóloga de la OGG1 en humanos) (Xia *et al.*, 2019). Por su parte, en estudios con hepatocitos L-02 tratados con 2, 8 y 32 $\mu\text{M/L}$ de Cr(VI) durante 24 h se muestra que los niveles de ERO y 8-OHdG mitocondrial aumentan significativamente mientras que, los niveles de ARNm de hOGG1 celular y proteína hOGG1 mitocondrial disminuyeron. Esto sugiere que, la menor expresión del gen hOGG1 celular podría disminuir la capacidad de reparación del ADN mitocondrial (Li *et al.*, 2012). Asimismo, Hodges y Chipman (2002), observaron que el tratamiento con dicromato de sodio en células de carcinoma de pulmón humano A549 disminuía la expresión del gen hOGG1, sugiriendo que la inhibición de la expresión de este gen contribuye a la genotoxicidad como resultado de la disminución de la capacidad para reparar el aducto 8-OHdG. Estos hallazgos, nos permiten sugerir que en nuestro estudio, el Cr(VI) puede estar inhibiendo enzimas de reparación, como la OGG1 y por lo tanto, ocasionar una disminución en la capacidad para reparar las rupturas de cadena sencilla y doble del ADN.

Cuando se administró el tratamiento de los extractos polifenólicos del té verde previo al de CrO_3 se observó una disminución en las frecuencias de MN de hasta 76% a las 24 h con respecto al tratamiento solo de CrO_3 . Esta disminución indica un efecto antígenotóxico de los extractos polifenólicos. En estudios en ratones hembra de la cepa balb/C, se observó que el tratamiento con EGCG (durante 15 días) previo a la exposición al arsénico trivalente (durante 10 días), disminuye las frecuencias de los MN, las aberraciones cromosómicas, las rupturas de cadena sencilla y doble, así como la producción de ERO. Los autores concluyeron que la EGCG además de tener un alto potencial antioxidante inhibe la genotoxicidad inducida por metales con potencial cancerígeno como el arsénico (Kaushal *et al.*, 2019). Particularmente, en estudios previos en nuestra línea de investigación se ha mostrado que los tratamientos previos con té verde o EGCG pueden disminuir el daño al ADN inducido por Cr(VI) (33 y 44%, respectivamente), mientras que, los extractos polifenólicos del té verde disminuyen hasta casi un 100% (García-Rodríguez *et al.*,

2013; García-Rodríguez, 2019). El alto porcentaje de esta eficacia antigenotóxica por parte de los extractos polifenólicos del té verde se ha relacionado a su contenido de 60% de catequinas totales. Estas pueden actuar como donantes de hidrogeno para suprimir la formación de RL y pueden quelar metales a través de sus grupos orto-hidroxi-fenólicos (Aherne y O'Brien, 2000; Caillet *et al.*, 2007). Si bien, el hecho de que la disminución de las frecuencias de MN en el grupo tratado con los extractos polifenólicos del té verde y CrO₃ podría relacionarse con la captura de los RL como el •OH, también los mecanismos de reparación podrían ser reactivados por el extracto. La disminución temprana desde las 4 h de las UA en el grupo tratado con los extractos polifenólicos del té verde previo al CrO₃ podría indicar que los extractos están reactivando los mecanismos de reparación. En estudios *in vitro*, otros polifenoles como el resveratrol sobre el daño oxidativo en el ADN de linfocitos periféricos humanos, han mostrado que este puede activar el sistema de BER al aumentar la expresión del OGG1 (Yan *et al.*, 2012). La vía de BER es una de las vías de reparación del ADN más comunes y eficientes (Aka *et al.*, 2004; Iarmarcovai *et al.*, 2008). Particularmente, en estudios *in vivo*, como el realizado por Ho y colaboradores (2014), se muestra que la ingesta de té verde (en una sola dosis y el consumo continuo por 7 días) en hombres sanos aumenta la actividad de la hOGG1 y disminuye las lesiones inducidas por la oxidación en el ADN en linfocitos de sangre venosa. Esto al evaluar el daño en el ADN y la actividad de hOGG1 utilizando, el EC estándar y modificado con la enzima hOGG1, respectivamente. En este sentido, la disminución temprana a partir de las 4 h en dicho grupo, sugiere una posible reactivación de la reparación del daño al ADN, ya que, si tomamos en cuenta que los MN formados por daño clastogénico se generan desde el primer tiempo evaluado (24 h) por el proceso de eritropoyesis (Krishna & Hayashi, 2000), el daño a esa hora nos indica que las células podrían estar en el primer punto de control del daño (G1/S), llegando a reparar las rupturas en la cadena a pesar de no presentar una diferencia significativa en comparación con el grupo de CrO₃. De esta forma, la

reactivación de la reparación del daño al ADN puede ser una razón por la cual la disminución de los MN en el grupo de P60+CrO₃ sea constante a partir de las 24h.

En el análisis de citotoxicidad evaluado por la relación de EPC/ENC se observó un aumento significativo de los EPC/ENC en los grupos de CrO₃ y P60+CrO₃. Esto puede indicar que el Cr(VI) tiene un efecto citotóxico ya que, el tratamiento de los extractos polifenólicos del té verde no altera la relación de EPC/ENC. Si bien, la OECD (2016) indica que, al realizar la prueba de MN se determine también la frecuencia de EPC/ENC, este parámetro se debe tomar con reserva, ya que, cuando un compuesto causa muerte celular, pueden activarse también los mecanismos de división celular y, por lo tanto, se puede enmascarar el efecto. (Hayashi *et al.*, 2000). El efecto citotóxico de los compuestos de Cr(VI) ha sido reportado en diversos estudios (O'Brien *et al.*, 2003). En un estudio realizado por Wise y colaboradores (2006), se muestra que el Cr(VI) es citotóxico para las células epiteliales de pulmón humano al reducir la viabilidad celular y aumentar la clastogénesis del cromosoma de plomo en una línea de células epiteliales bronquiales, BEP2D. En otros estudios *in vivo* e *in vitro* se muestra que los compuestos de Cr(VI) aumentan la pérdida de la viabilidad celular al incrementar la tasa de células necróticas y los niveles del TNF- α (factor de necrosis tumoral- α). Mostrando que, una cascada de eventos celulares que incluyen el estrés oxidativo y el daño en el ADN están involucrados en la toxicidad y la carcinogénesis inducidas por Cr(VI) (Bagchi *et al.*, 2002; Karaulov *et al.*, 2019; Shil y Pal, 2019). De ahí que los compuestos de Cr(VI) son altamente tóxicos para las células, y su citotoxicidad parece estar mediada por la producción de estrés oxidante y el daño en el ADN.

9. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

- El CrO₃ induce daño genotóxico ya que incrementa las frecuencias de MN, las rupturas de cadena sencilla y doble en el ADN.
- El CrO₃ induce daño citotóxico ya que modifica la relación de EPC/ENC.
- Los extractos polifenólicos del té verde no inducen daño genotóxico ni citotóxico debido a que no aumenta las frecuencias de MN, rupturas de cadena sencilla y doble en el ADN, ni modifican la relación de EPC/ENC.
- Los extractos polifenólicos del té verde presentaron efectos antígenotóxicos al disminuir las frecuencias de MN y las rupturas de cadena sencilla y doble del ADN inducidas por el CrO₃.
- El hecho de que se hayan disminuido las rupturas de cadena sencilla y doble en el ADN a partir de las 4h, en el grupo tratado con los extractos polifenólicos del té verde previo a la exposición al CrO₃, sugiere que el extracto pudo haber reactivado la reparación del daño oxidativo en el ADN inducido por el CrO₃.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, I. D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I., y Hayashi, M. (1998). Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 417(1), 19–30.
- Aherne, S. A., y O'Brien, N. M. (2000). Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(6) 507-514.
- Ahmad, S., Tan, M. L., y Hamid, S. (2023). DNA repair mechanisms: Exploring potentials of nutraceutical. *Journal of Functional Foods*, 101, 105415.
- Aka, P., Mateuca, R., Buchet, J. P., Thierens, H., y Kirsch-Volders, M. (2004). Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556(1–2), 169–181.
- Altieri, F., Grillo, C., Maceroni, M., y Chichiarelli, S. (2008). DNA damage and repair: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(5), 891–937.
- Andreassi, M. G., Foffa, I., Manfredi, S., Botto, N., Cioppa, A., y Picano, E. (2009). Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, APE1 and XRCC3 DNA repair genes, ionizing radiation exposure and chromosomal DNA damage in interventional cardiologists. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 666(1–2), 57–63.
- Ansoar-Rodríguez, Fontanetti, C. A. C., Del, S., y Díaz-Llera, C. (2015). Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46(1), 51–62.
- Arellano G. M. E., Camarena-Ojinaga, L., Von-Glascoe, C. A., Ruiz-Ruiz, B., Zúñiga-Violante, E., y Montaña-Soto, T. (2012). Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos a plaguicidas en cuatro localidades de Baja California. *Género, Ambiente y Contaminación Por Sustancias Químicas*, 12(2), 93–101.
- Ayala-Mata, F., Barrera-Mendoza, C. C., Cortés-Rojo, C., Montoya-Pérez, R., García-Pérez, M. E., y Rodríguez-Orozco, A. R. (2019). Antioxidants in asthma: Polyphenols | Antioxidantes en asma: polifenoles. *Medicina Interna de Mexico*, 35(2), 223–234.
- Ayala, M. C., Hernández, Y. G., Piñeiro, J. C. G., y González, E. P. (2004). Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del

- daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta A en células sanguíneas humanas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(3), 277–284.
- Azurmendi, P. J. (2016). 2015 Nobel Prize in Chemistry: DNA repair mechanisms, from bacteria to tumors. *Medicina*, 76(3), 183–186.
- Bagchi, D., Stohs, S. J., Downs, B. W., Bagchi, M., y Preuss, H. G. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, 180(1) 5-22.
- Bhattacharya, A., Gupta, A., Kaur, A., y Malik, D. (2019). Alleviation of hexavalent chromium by using microorganisms: Insight into the strategies and complications. *Water Science and Technology*, 79(3), 411–424.
- Blasiak, J., y Kowalik, J. (2000). A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 469(1), 135–145.
- Caillet, S., Yu, H., Lessard, S., Lamoureux, G., Ajdukovic, D., y Lacroix, M. (2007). Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry*, 100(2) 542-552.
- Carrera, E. (1997). NTP 269: Cancerígenos, mutágenos y teratógenos: manipulación en el laboratorio. In *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261.
- Collins, A. R. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(2), 794–800.
- Corrales, L. C., y Muñoz, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 135–250.
- Cuberos, E., Rodriguez, A. I., y Prieto, E. (2009). Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 11(2), 278–289.
- Da Silva, J., De Freitas, T. R. O., Marinho, J. R., Speit, G., y Erdtmann, B. (2000). An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1), 241–245.
- Das, K. K., Dhundasi, S. A., y Das, S. N. (2011). Hexavalent chromium and its effect on health: Possible protective role of garlic (*Allium sativum* Linn). *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 22(1–2), 3–10.

- DesMarias, T. L., y Costa, M. (2019). Mechanisms of chromium-induced toxicity. In *Current Opinion in Toxicology* (Vol. 14).
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Pandey, A. K., y Parmar, D. (2007). Protocol for the single cell gel electrophoresis / comet assay for rapid genotoxicity assessment. *Electrophoresis*, 17(3), 1–10.
- Elejalde G. J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 326–335.
- EPA. (1998). *Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. August.
- EPA. (2010). Toxicological Review of Hexavalent Chromium (CAS No. 18540-29-9). In *Review Literature And Arts Of The Americas*.
- FDA., (2000). Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use, USA.: Redbook. Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1-6.
- Ferré, N., Schuhmacher, M., Llobet, J., y Domingo, J. (2007). Metales pesados y salud: Diseño de un software para evaluar los riesgos de la exposición ambiental a través del agua, suelos y aire. *Mapfre Seguridad*, 27(108), 50–58.
- Flora, S. J. S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4), 191–206.
- García-Rodríguez M. C., López-Santiago, V., y Altamirano-Lozano, M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496(1), 145–151.
- García-Rodríguez, M. C., Vilches-Larrea, R. E., Nicolás-Mendez, T., y Altamirano-Lozano, M. A. (2012). El té verde en la quimiopreención in vivo del daño genotóxico inducido por metales cancerígenos (cromo [VI]). *Nutricion Hospitalaria*, 27(4), 1204–1212.
- García-Rodríguez, M. C., Carvente-Juárez, M. M., y Altamirano-Lozano, M. A. (2013). Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium-induced DNA damage in peripheral blood of CD-1 mice: Analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- García-Rodríguez, M. C., Carvente-Juárez, M. M., Montaña, A., y Altamirano-Lozano, M. (2014). *Effect of polyphenols (extract from green tea [P60] and epigallocatechin-3-gallate) on genotoxic damage induced by hexavalent chromium in polychromatic erythrocytes of mouse peripheral blood*.
- García-Rodríguez, M. C., Nicolás-Méndez, T., Serrano-Reyes, G., y Altamirano-Lozano, M. (2016). Simultaneous Evaluations of GSH Levels, SOD Activity and

the Genotoxic Damage in Mice Treated with Chromium(VI) and Catechins of Green Tea [(+)-Catechin and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate]. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, S106.

- García-Rodríguez, M. C. (2019). Polifenoles y vitaminas en la protección del daño genético inducido por metales con potencial cancerígeno. *Nutr Clin Med*, XIII(3), 129–139.
- García-Rodríguez, M. C., Gordillo-García, A., y Altamirano-Lozano, M. (2017). The Role of Vitamin C in the Protection and Modulation of Genotoxic Damage Induced by Metals Associated with Oxidative Stress. In *Vitamin C* (pp. 99–112).
- Gebhart, E. (2008). Mutagenicity, Carcinogenicity, and Teratogenicity. In *Elements and Their Compounds in the Environment* (pp. 433–457).
- Calva, G. L., y Torres, M. R. (2004). Metales pesados y sus efectos en organismos. *Laboratorio de Ecosistemas Costeros*, 51(1), 33–42.
- González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., y Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*, 25, 3–9.
- Hang, B. (2010). Formation and repair of tobacco carcinogen-derived bulky DNA adducts. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 1–29.
- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I. D., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., y Sutou, S. (2000). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 234–252.
- Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., y Ishidate, M. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research Letters*, 245(4), 245–249.
- Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T., Newell, G. W., y Salamone, M. F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 123(1), 61–118.
- Ho, C. K., Choi, S. W., Siu, P. M., y Benzie, I. F. F. (2014). Effects of single dose and regular intake of green tea (*Camellia sinensis*) on DNA damage, DNA repair, and heme oxygenase-1 expression in a randomized controlled human supplementation study. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(6) 1379-83.
- Hodges, N. J., y Chipman, J. K. (2002). Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxo-guanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 23(1) 55-60.
- Hsu, Y. W., Tsai, C. F., Chen, W. K., Huang, C. F., y Yen, C. C. (2011). A subacute

- toxicity evaluation of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49(10), 2624–2630.
- IARC (1990) Chromium and chromium compounds, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and their Supplements, 49, 49-256.
- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A., y Orsière, T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 658(3), 215–233.
- Isbrucker, R. A., Bausch, J., Edwards, J. A., y Wolz, E. (2006). Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: Genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 44(5), 626–635.
- Jomova, K., y Valko, M. (2011). Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. *Current Pharmaceutical Design*, 17(31), 3460–3473.
- Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(9–10), 1865–1879.
- Karaulov, A. V., Renieri, E. A., Smolyagin, A. I., Mikhaylova, I. V., Stadnikov, A. A., Begun, D. N., Tsarouhas, K., Buha-Djordjevic, A., Hartung, T., y Tsatsakis, A. (2019). Long-term effects of chromium on morphological and immunological parameters of Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 133.
- Kaushal, S., Ahsan, A. U., Sharma, V. L., y Chopra, M. (2019). Epigallocatechin gallate attenuates arsenic induced genotoxicity via regulation of oxidative stress in balb/C mice. *Molecular Biology Reports*, 46(5) 5355-5369.
- Krishna, G., y Hayashi, M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 155–166.
- Lagroye, I., Hook, G. J., Wettring, B. A., Baty, J. D., Moros, E. G., Straube, W. L., y Roti Roti, J. L. (2004). Measurements of Alkali-Labile DNA Damage and Protein-DNA Crosslinks after 2450 MHz Microwave and Low-Dose Gamma Irradiation in Vitro. *Radiation Research*, 161(2), 201–214.
- Lagunas, A. (2018). Daño y reparación del ADN. *Ciencia*, 69(4), i7–i11.
- Lagunas-Cruz, M. C., Valle-Mendiola, A., y Soto-Cruz, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Laboratorio de Oncología Molecular. Unidad de Investigación*, 17(2), 98–107.
- Lee, J. C., Son, Y. O., Pratheeshkumar, P., y Shi, X. (2012). Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(4), 742–757.
- Lejding, T., Mowitz, M., Isaksson, M., Bruze, M., Pontén, A., Svedman, C., Zimerson, E., y Engfeldt, M. (2018). A retrospective investigation of hexavalent chromium

- allergy in southern Sweden. *Contact Dermatitis*, 78(6), 386–392.
- Li, P., Zhong, C., Wang, A., Guan, L., Xiao, F., Zou, Y., y Yang, Y. (2012). Effect of hOGG1 gene on the oxidative damage of mitochondrial DNA induced by hexavalent chromium. *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research*, 41(3) 385-9.
- Liao, W., McNutt, M. A., y Zhu, W. G. (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), 46–53.
- Londoño F. L. F., Londoño-Muñoz, P. T., y Muñoz-García, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Bioteconología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145–153.
- Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., y Márquez, J. (2010). Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(9), 1328–1341.
- Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., y Heddle, J. A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 239(1), 29–80.
- Mishra, M., Sharma, A., Shukla, A. K., Pragma, P., Murthy, R. C., De Pomerai, D., Dwivedi, U. N., y Chowdhuri, D. K. (2013). Transcriptomic analysis provides insights on hexavalent chromium induced DNA double strand breaks and their possible repair in midgut cells of *Drosophila melanogaster* larvae. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 747–748, 28–39.
- Montaño-Rodríguez, A. R. (2013). *Efecto de la (-)-epigallocatequina-3-galato sobre la inducción de micronúcleos y de apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo por vía oral e intraperitoneal*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morais, S., e Costa, F. G., y Pereir, L. M. de. (2012). Heavy Metals and Human Health. In *Environmental Health - Emerging Issues and Practice* (pp. 227–246).
- Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar A. I., y López, M. J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 1–17.
- Nesslany, F. (2017). The current limitations of in vitro genotoxicity testing and their relevance to the in vivo situation. *Food and Chemical Toxicology*, 106(Part B), 609–615.
- Netzahuatl-Muñoz, A. R., Pineda-Camacho, G., Barragán-Huerta, B. E., y Cristiani-Urbina, E. (2010). Remoción de cromo hexavalente y cromo total por la corteza de *Pyrus communis*. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 41, 1–10.

- Nicolás-Méndez, T., Kacew, S., Ortiz-Muñiz, A. R., Mendoza-Núñez, V. M., y García-Rodríguez, M. C. (2022). Protective Effect of Resveratrol against Hexavalent Chromium-Induced Genotoxic Damage in HsdICR Male Mice. *Molecules*, 27(13), 4028.
- Nogueira, M. E. I., Passoni, M. H., Biso, F. I., Longo, M. D. C., Cardoso, C. R. P., Santos, L. C. Dos, y Varanda, E. A. (2006). Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicology in Vitro*, 20(3), 361–366.
- O'Brien, T. J., Ceryak, S., y Patierno, S. R. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research*, 533(1–2), 3–36.
- OECD. (1997). Guideline for the testing of chemicals, mammalian erythrocyte micronucleus test. *Guidelime 474, July*, 1–10.
- OECD (2016) Mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD guideline for the testing of chemicals 474.
- OEHHA. (2016). Efectos del Cromo Hexavalente Sobre la Salud. In *Science for a healthy California*.
- Orsine, J. V. C., Novaes, M. R. C. G., Asquiere, E. R., y Cañete, R. (2014). Determination of chemical antioxidants and phenolic compounds in the Brazilian Mushroom *Agaricus sylvaticus*. *West Indian Medical Journal*, 63(2), 142–146.
- Pfau, W. (2012). Mutagenic Agents. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 23, 597–605.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., y Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189–207.
- Rodríguez-rey, A., Noris-garcía, I. E., María, I. I., y Fundora, T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa Principles and relevance of the comet assay. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica*, 35(2), 184–194.
- Rodríguez-Heredia, D. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. *Medisan*, 21(12), 3372–3385.
- Sánchez-Valle, V., y Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*, 20(3), 161–168.
- Shi, X., & Dalal, N. S. (1992). The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radical: The Cr(VI) haber-weiss cycle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292(1), 323–327.

- Shil, K., y Pal, S. (2019). Metabolic and morphological disorientations in the liver and skeletal muscle of mice exposed to hexavalent chromium. *Comparative Clinical Pathology*, 28(6) 1729–1741.
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 122–126.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.
- Tafurt C. Y., y Marin, M. M. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*, 13(2), 95–110.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., y Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (Vol. 101, pp. 133–164).
- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M. G., Macriz-Romero, N., Flores-García, A., y Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *El Residente*, 8(1), 4–11.
- Trzeciak, A., Kowalik, J., Malecka-Panas, E., Drzewoski, J., Wojewodzka, M., Iwanenko, T., y Blasiak, J. (2000). Genotoxicity of chromium in human gastric mucosa cells and peripheral blood lymphocytes evaluated by the single cell gel electrophoresis (comet assay). *Medical Science Monitor*, 6(1), 24–29.
- Valenzuela B., A. (2004). El consumo te y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Revista Chilena de Nutrición*, 31(2), 72–82.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., y Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.
- Wise, S. S., Holmes, A. L., y Wise, J. P. (2006). Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to human lung epithelial cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 610(1–2).
- Wong, V. W. C., Szeto, Y. T., Collins, A. R., y Benzie, I. F. F. (2005). The comet assay: A biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 3(1), 1–14.
- Xia, H., Ying, S., Feng, L., Wang, H., Yao, C., Li, T., Zhang, Y., Fu, S., Ding, D., Guo, X., Tong, Y., Wang, X., Chen, Z., Jiang, Z., Zhang, X., Lemos, B., y Lou, J. (2019). Decreased 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) expression and DNA oxidation damage induced by Cr (VI). *Chemico-Biological Interactions*, 299, 44–51.
- Yan, Y., Yang, J. Y., Mou, Y. H., Wang, L. H., Zhou, Y. N., y Wu, C. F. (2012).

Differences in the activities of resveratrol and ascorbic acid in protection of ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 168–174.

Yoshikawa, T., y Naito, Y. (2002). What is oxidative stress? *Jpn Med Assoc J*, 45(7), 271–276.

Zarei, I., Pourkhabbaz, A., Alipour, H., y Khazaei, S. H. (2013). Acute Toxicity and the Effects of Copper Sulphate (CuSO₄ · 5H₂O) on the Behavior of the Black Fish (*Capoeta Fusca*). *Iranian Journal of Toxicology*, 6(19), 771–778.

Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42.

Zhang, X., Zhang, X., Zhang, L., Chen, Q., Yang, Z., Yu, J., Fu, H., y Zhu, Y. (2012). XRCC1 Arg399Gln was associated with repair capacity for DNA damage induced by occupational chromium exposure. *BMC Research Notes*, 29(5), 263.

Zuluaga, Q. M., Valencia, R. A. M., y Ortiz, T. I. C. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina U.P.B.*, 28(1), 33–41.